



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

239434

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 07 H 5/06

(22) Přihlášeno 29 05 84
(21) (PV 4023-84)

(40) Zveřejněno 15 05 85

(45) Vydáno 16 04 87

(75)

Autor vynálezu

SKÁLA LADISLAV RNDr., PRAHA

(54) Způsob přípravy D-mannosaminu značeného radioisotopem ^{14}C nebo stabilním isotopem ^{13}C

Způsob přípravy D-mannosaminu značeného radioisotopem ^{14}C nebo stabilním isotopem ^{13}C .

Podstata navrženého řešení spočívá v tom, že značená D-fruktoza se uvede v reakci s methanolickým nebo ethanolickým amoniakem, připraveným nasycením příslušného alkoholu při 0 °C, s výhadeu při teplotě 18 až 24 °C po dobu 25 až 30 dnů v uzavřeném systému v přítomnosti jednoho nebo více katalyzátorů vybraných ze skupiny zahrnující kyselinu benzoovou, kyselinu jantarovou, kyselinu glutarovou a kyselinu šťavelovou, výhodně v celkovém množství 0,03 až 0,09 mmol na 1 mg výchozí D-fruktozy.

Vynález řeší způsob přípravy D-mannosaminu značeného radioisotopem ^{14}C nebo stabilním isotopem ^{13}C .

D-Mannosamin se vyskytuje ve skeletu fyziologicky velmi důležité kyseliny N-acetyl-neuraminové /Comb D. G., Roseman S.: J. Amer. Chem. Soc. **80**, 497, 3 166 /1958//. Z toho důvodu o něj vzrůstá zájem v biochemickém i lékařském výzkumu a je nesporné, že zejména užitečný je v tomto ohledu D-mannosamin značený isotopy uhlíku.

D-mannosamin je obtížně dostupný. Za nejobvyklejší způsob jeho přípravy je považována nitromethanová syntéza, vycházející z D-arabiny /Sowden J. C., Oftedahl M. L.: Methods Carbohydr. Chem. **1**, 235 /1962//. Jedná se o čtyřstupňový postup, jehož první fází je příprava směsi 1-nitro-1-deoxy-D-hexitolů kondenzací D-arabiny s nitromethanem /Fischer H. O.: J. Amer. Chem. Soc. **62**, 1 048, 1963 /1947//, druhou fází je příprava D-arabino-tetraacetox-1-nitro-1-hexenu /Sowden J. C., Fischer H. O.: J. Amer. Chem. Soc. **62**, 1 048 /1947//, třetí fází příprava 2-acetamido-1,2-dideoxy-1-nitro-D-mannitolu /O'Neill A. N.: Can. J. Chem. **37**, 1 747 /1959//, který je v závěrečné fázi ve formě sodné soli převáděn na D-mannosamin /ve formě hydrochloridu/ působením kyseliny chlorevodíkové /Sowden J. C., Oftedahl M. L.: J. Amer. Chem. Soc. **82**, 2 303, /1960//. Konečný výtěžek bývá 15 % D-mannosaminu.

Ještě nižší výtěžek poskytuje kondenzace D-arabiny s kyanidy v přítomnosti benzylaminu a následující kontrolovaná redukce /Kuhn R., Bister W.: Ann. **602**, 217 /1957//.

Jinou možností přípravy D-mannosaminu je epimerizace D-glukosaminu. Vzhledem k nestálosti volného D-glukosaminu není ovšem jeho přímá epimerizace možná. Proto se k tomuto účelu využívá kyselina D-glukosaminová a následující redukci /Levene P. A.: J. Biol. Chem. **36**, 73 /1918// a Levene P. A.: J. Biol. Chem. **39**, 69 /1919// nebo N-acetyl-D-glukosaminu a následující hydrolýze /Spivak C. T., Roseman S.: J. Amer. Chem. Soc. **81**, 2 403 /1959//.

Při přípravě D-glukosaminu z D-fruktosy byl vznik D-mannosaminu pozorován jen ve stepevních množstvích /Heyns K., Paulsen H., Eichstedt R., Rella M.: Chem. Ber. **90**, 2 039 /1957//, nebo není zmiňován vůbec.

Nevějí bylo pozorováno, že při přípravě D-/U- ^{14}C /glukosaminu reakcí D-/U- ^{14}C /fruktosy s amoniakem se mezi vedlejšími produkty objevuje D-/U- ^{14}C /mannosamin v množstvích do 5 %.

Žádná z dosud popsaných metod přípravy D-mannosaminu není příliš vhodná pro přípravu D-mannosaminu značeného isotopy uhlíku. Postupy jsou komplikované řadou reakčních stupňů, nezbytností připravovat funkční nebo substituční deriváty a krycí skupiny opět odstraňovat, což by ještě více zvýšilo ztráty při práci s miligramovými kvanty radioaktivních látek.

Výše uvedené nedostatky odstraňuje způsob přípravy D-mannosaminu, značeného radioisotopem ^{14}C nebo stabilním isotopem ^{13}C , jehož podstata spočívá v tom, že D-fruktosa se uvede v reakci s methanolicým nebo ethanolicým amoniakem, připraveným nasycením příslušného alkoholu při 0 °C, s výhledu při teplotě 18 až 24 °C po dobu 25 až 30 dnů v uzavřeném systému, v přítomnosti jedné nebo více katalyzátorů vybraných ze skupiny zahrnující kyselinu benzoovou, kyselinu jantarovou, kyselinu glutarovou, kyselinu šťavelovou, výhodně v celkovém množství 0,03 až 0,09 mmol na 1 mg výchozí D-fruktosy.

Do reakční směsi se může přidat chlorid amonný, s výhledu v množství 0,008 až 0,025 mmol na 1 mg výchozí D-fruktosy.

Provádí-li se reakce v přítomnosti chloridu amonného, může se katalyzátor, vybraný ze skupiny kyselin, přidat až v jejím průběhu, s výhodou po 8 až 10 dnech.

Výhodou tohoto způsobu přípravy D-mannesaminu, značeného radioisotopem ^{14}C nebo stabilním isotopem ^{13}C , spočívá v tom, že

- vychází z dostupné výchozí látky,
- reakce probíhá za mírných podmínek a provedení je jednoduché,
- umožňuje současně získat 30 až 40 % značeného D-glukosaminu,
- umožňuje regenerovat 10 až 20 % výchozí značené D-fruktosy,
- výtěžnost je srovnatelná s obvyklými postupy přípravy nezačeného D-mannesaminu.

Způsob podle vynálezu je dále objasněn v následujících příkladech provedení.

P ř í k l a d 1

D-/U- ^{14}C /fruktosa /96 MBq/ se vysuší vakuovým vymrazením, přidá se 5 ml bezvodého methanolu, 2 mg chloridu amonného v 0,2 ml bezvodého methanolu a roztok se nasatí plyným amoniakem při 0 °C. Reakční směs se nechá stát v tlakové nádobě při teplotě 20 až 23 °C a po 3 a 6 dnech se opět nasatí plyným amoniakem při 0 °C.

Po 9 dnech reakce se přidá 0,5 ml roztoku 5,8 mg kyseliny šťavelové v bezvodém ethanolu a opět nasatí amoniakem. Sycení se znovu opakuje po 12 a 15 dnech reakce.

Po 27 dnech se směs ochladí na 0 až 5 °C, vakuově odpaří při co nejnižší teplotě téměř k suchu a přidá se 0,003 mmol kyseliny chlorovodíkové v 0,3 ml vody.

D-/U- ^{14}C /mannesamin ve formě hydrochloridu se izoluje preparativní papírovou chromatografií na papíře Whatman 3 v soustavě n-butanol-ethanol-veďa 52:33:15 současně s hydrochloridem D-/U- ^{14}C /glukosaminu a D-/U- ^{14}C /fruktosou.

Radiochemický výtěžek 16 % D-/U- ^{14}C /mannosaminu, 38 % D-/U- ^{14}C / glukosaminu a 14 % D-/U- ^{14}C /fruktosy, tj. 15,4, 36,5 a 13,4 MBq.

P ř í k l a d 2

D-/U- ^{14}C /fruktosa /153 MBq/ se vysuší vakuovým vymrazením, přidá se 15 ml bezvodého methanolu, roztok se nasatí plyným amoniakem při 0 °C a přidá se 0,8 ml na stejnou teplotu ochlazeného roztoku směsi 5,0 mg kyseliny jantarevé a 5,2 mg kyseliny benzoové v bezvodém methanolu.

Reakční směs se nechá stát v tlakové nádobě při teplotě 20 až 23 °C po dobu 30 dnů, přičemž prvních 15 dnů se několikrát nasatí amoniakem při 0 °C.

Poté se zpracuje, jak je uvedeno v příkladu 1.

Radiochemický výtěžek 30,6 MBq D-/U- ^{14}C /mannosaminu, tj. 20 %, 53,6 MBq D-/U- ^{14}C /glukosaminu, tj. 35 % a 22,9 MBq D-/U- ^{14}C /fruktosy, tj. 15 %.

P ř í k l a d 3

D-/U- ^{14}C /fruktosa /90 MBq/ se vysuší vakuovým vymrazením, přidá se 12 ml bezvodého ethanolu, 1,2 mg pevného chloridu amonného, 0,5 ml roztoku směsi 2,8 mg kyseliny jantarevé a 2,4 mg kyseliny glutarové v bezvodém ethanolu a nasatí se plyným amoniakem při 0 °C.

Reakční směs se nechá stát v tlakové nádobě při teplotě 24 °C po dobu 25 dnů, přičemž prvních 10 dnů se několikrát nasytí plynným amoniakem při 0 °C.

Poté se zpracuje, jak je uvedeno v příkladu 1.

Radiochemický výtěžek 13,5 MBq /15 %/ D-/U-¹⁴C/mannosaminu, 29,7 MBq /33 %/ D-/U-¹⁴C/-glukosaminu a 15,3 MBq /17 %/ D-/U-¹⁴C/fruktozy.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob přípravy D-mannosaminu značeného radioisotopem ¹⁴C, nebo stabilním isotopem ¹³C, vyznačený tím, že značená D-fruktosa se uvádě v reakci s methanolickým nebo ethanolickým amoniakem, připraveným nasycením příslušného alkoholu při 0 °C, s výhodou při teplotě 18 až 24 °C po dobu 25 až 30 dnů v uzavřeném systému v přítomnosti jedné nebo více katalyzátorů vybraných ze skupiny zahrnující kyselinu benzoovou, kyselinu jantarovou, kyselinu glutarovou a kyselinu šťavelovou, výhodně v celkovém množství 0,03 až 0,09 mmol na 1 mg výchozí D-fruktozy.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že do reakční směsi se přidá chlorid amonný, s výhodou v množství 0,008 až 0,025 mmol na 1 mg výchozí D-fruktozy.

3. Způsob podle bodu 2, vyznačený tím, že katalyzátor, vybraný ze skupiny kyselin, se přidá až v průběhu reakce, s výhodou po 8 až 10 dnech.